

## EFEITO INIBIDOR DO SORO DE RATOS COM INSUFICIÊNCIA RENAL AGUDA E CRÔNICA SOBRE A ATIVIDADE FAGOCITÁRIA "IN VITRO"

Maria ORI (1), Antonio Carlos SEGURO (2) & Antonino dos Santos ROCHA (3)

### RESUMO

O efeito do soro de ratos com insuficiência renal aguda e crônica sobre a atividade fagocitária foi estudado "in vitro" em cultura de macrófagos. A atividade eritrofagocitária destas células foi menor na presença de soro de animais com insuficiência renal aguda e crônica quando comparados ao plasma normal. Esta inibição persistiu quando estes soros foram filtrados através de membranas PM-30, sendo porém abolida quando filtrados através de membrana PM-10. Estes dados sugerem a presença de um fator no soro urêmico que inibe a fagocitose, cujo peso molecular varia entre 10.000 e 30.000 daltons.

**UNITERMOS:** Insuficiência renal aguda; Insuficiência renal crônica; Fagocitose; Macrófagos.

### INTRODUÇÃO

Pacientes com insuficiência renal crônica têm incidência elevada de infecções<sup>6</sup>; de modo semelhante, na insuficiência renal aguda associada à sépsis, a taxa de mortalidade atinge valores médios de 65%<sup>2</sup>. Estes fatos indicam que é importante conhecer os mecanismos responsáveis pela perda da defesa do organismo na falência renal.

Vários estudos com polimorfonucleares isolados de pacientes com insuficiência renal crônica têm mostrado menor atividade fagocitária destas células, sugerindo a presença de um fator

no soro urêmico responsável por esta diminuição da fagocitose<sup>1, 8</sup>. Entretanto, estes estudos compreendem uma população heterogênea, influenciada por fatores como dieta, diálise, presença ou não de hiperfosfatemia<sup>3, 11</sup>, que podem modificar esta atividade celular.

Com o objetivo de melhor caracterizar este fenômeno, nós estudamos a atividade eritrofagocitária de cultura de macrófagos obtidos do peritônio de ratos, na presença de soro de animais com insuficiência renal aguda e crônica, assim como procuramos determinar a faixa de peso

Trabalho realizado no Laboratório de Pesquisa Básica do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM HC/FMUSP) São Paulo, SP, Brasil.

(1) Bióloga do Laboratório de Pesquisa Básica dos Laboratórios de Investigação Médica LIM HC/FMUSP, bolsista do CNPq. São Paulo, SP, Brasil.

(2) Médico Assistente do Laboratório de Pesquisa Básica dos Laboratórios de Investigação Médica LIM HC/FMUSP. São Paulo, SP, Brasil.

(3) Professor Titular da Disciplina de Clínica Geral e Propedêutica do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da USP. São Paulo, SP, Brasil.

**Endereço para correspondência:** Dra. Maria Ori, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Lab. Pesquisa Básica, 2º andar, Av. Dr. Arnaldo, 455. CEP 01246, São Paulo, SP, Brasil.

molecular de um fator sérico inibitório da fagocitose.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Cultura de macrófagos

Os macrófagos foram obtidos do exsudato de peritônio, estimulado com tioglicolato. Ratos machos de aproximadamente 120 g, foram submetidos à administração intraperitoneal de 5 ml de uma solução 2,98 g% de tioglicolato (Difco). Após 5 dias, 5 ml de tampão fosfato PBS era injetado no peritônio, 15 minutos depois a cavidade peritoneal foi aberta e retirado o exsudato peritoneal com pipetas Pasteur, colocado em tubo de ensaio, lavado com tampão fosfato e centrifugado, sendo desprezado o sobrenadante. Após 3 lavagens os macrófagos sedimentados eram suspensos em 1 ml de meio RPMI-1640 (Interlab). Uma gota desta suspensão era então colocada em lamínulas e deixada por 1 hora, afim de que os macrófagos aderissem à lamínula. Após este tempo as células não aderidas eram retiradas por lavagem com tampão fosfato. As lamínulas com os macrófagos aderidos eram então colocadas em garrafas de cultura contendo 3 ml de meio RPMI-1640 e 0,3 ml de soro fetal bovino à 37°C gaseificado com 95% de O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>, durante 24 a 48 horas.

### Preparo de hemácias de carneiro

Um mililitro de hemácias de carneiro, fornecidas pelo Instituto Adolfo Lutz, era lavado e centrifugado por três vezes em 1 ml de tampão fosfato; ao final, as hemácias eram suspensas em 1 ml de meio RPMI-1640. A sensibilização das hemácias foi feita adicionando-se 1 ml de hemolisina a 1 ml de meio RPMI-1640 contendo as hemácias. Esta suspensão foi incubada à 37°C por 30 minutos, após os quais o excesso de hemolisina era retirado através de lavagens sucessivas com tampão fosfato. Um ml da suspensão foi então diluído em 2 ml de meio RPMI-1640.

### Estudo da fagocitose

Precedendo o estudo de fagocitose, às garrafas de cultura contendo as lamínulas com macrófagos foi adicionado soro de rato normal ou soro de rato submetido à condição experimental (insuficiência renal). Após 2 horas de incubação à

37°C, as lamínulas eram retiradas das garrafas e cobertas com aproximadamente 1 ml de suspensão de hemácias de carneiro sensibilizadas com hemolisina. Após 1 hora de incubação à 37°C, o excesso de hemácias foi lavado com tampão fosfato por 4 vezes. As lamínulas eram então coradas com hematoxilina-eosina.

Em cada lamínula de um total de 100 macrófagos foi contado o número de células que haviam fagocitado as hemácias e a atividade fagocitária expressa em %.

### Grupos de estudo

#### 1. Soro de rato com insuficiência renal crônica

A insuficiência renal crônica foi produzida nos ratos através de nefrectomia unilateral acompanhada de lesão do rim contralateral produzida por ácido sulfúrico a 1%, passado com um cotonete pela córtex renal. O soro destes animais foi obtido após 21 dias, quando a uréia sérica nos mesmos foi em torno de 90 a 130 mg/dl, semelhante a níveis obtidos com outros modelos<sup>9, 10</sup>. Parte deste soro era filtrado através de membranas PM-10 e 30 (Amicon Corp. Lexington - Mass 02173 - USA - Ultrafiltration Cell - model 75 PS 1), afim de separar moléculas de peso molecular inferior a 10.000 e 30.000 respectivamente.

#### 2. Soro de rato com insuficiência renal aguda

A insuficiência renal aguda foi feita através da ligadura dos dois ureteres do animal e o soro foi obtido após 24 horas, quando a uréia plasmática foi em torno de 300 mg/dl. Neste grupo, parte do soro foi ultrafiltrado em membrana PM-30 e PM-10.

A análise estatística foi feita pelo teste de t não pareado e análise de variância, com nível de significância para  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

A atividade fagocitária, medida através da porcentagem de macrófagos que fagocitaram hemácias de carneiro sensibilizadas com hemolisina na presença de soro normal, está apresentada na figura 1 e foi de  $83,9 \pm 2,2\%$ ; quando outras culturas de macrófagos foram incubadas

Atividade Fagocitária

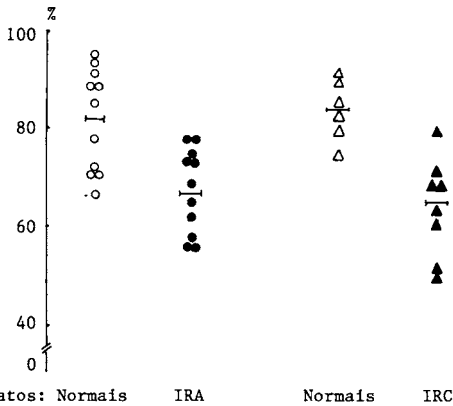


Fig. 1 — Atividade fagocitária medida através da porcentagem de macrófagos que fagocitaram hemácias de carneiro sensibilizadas com hemolisina, na presença de soro de ratos normais (controles), ratos com insuficiência renal aguda (IRA) e ratos com insuficiência renal crônica (IRC).

na presença de soro obtido de rato com insuficiência renal crônica (uréia de  $112,3 \pm 4,2$  mg/dl), a atividade fagocitária foi menor ( $62,3 \pm 4,5\%$ ,  $p < 0,01$ ).

Quando os macrófagos eram previamente incubados com soro obtido de ratos com insuficiência renal aguda (uréia de  $379,2 \pm 20,5$  mg/dl), a sua atividade fagocitária foi significativamente menor ( $66,6 \pm 1,4\%$ ,  $p < 0,01$ ) do que as culturas controle pré-incubadas com soro normal ( $81,4 \pm 2,7\%$ ), indicando que também na insuficiência renal aguda existe uma fração do soro urêmico que inibe a fagocitose pelos macrófagos. Não houve diferença da atividade fagocitária na presença de soro com insuficiência renal crônica ( $62,3 \pm 4,5\%$ ) e aguda ( $66,6 \pm 1,4\%$ ).

A atividade fagocitária foi também medida na presença de soro obtido de ratos com insuficiência renal crônica e filtrado através de membranas PM-30 e PM-10. A tabela 1 mostra que a atividade fagocitária de macrófagos incubados com soro urêmico e com soro urêmico filtrado através de membrana PM-30, foi respectivamente  $64,8 \pm 3,2\%$  e  $64,7 \pm 3,0\%$ , significativamente menor que os obtidos com soro normal ( $82,3 \pm 3,5\%$ ), indicando estes dados, que a fração inibidora do soro tem um peso molecular inferior a 30.000. Por outro lado, quando os macrófagos foram incubados com soro urêmico ultrafiltrado em membrana PM-10, a atividade fagocitária foi de  $89,2 \pm 1,9\%$  igual ao soro normal. Portanto,

TABELA 1

Efeito do soro de ratos com insuficiência renal crônica (IRC) sobre a atividade fagocitária (%) de macrófagos em cultura.

	SORO			
	Normal	IRC	IRC PM-30	IRC PM-10
n =	12	8	8	6

IRC PM-30, IRC PM-10 correspondem ao soro de ratos filtrado em membranas PM-30 e PM-10. Os dados são média  $\pm$  erro padrão; \*;  $p < 0,01$  em relação ao normal; ★;  $p < 0,01$  em relação ao grupo IRC; n: n° de culturas.

a fração inibidora do soro urêmico deve ter um peso molecular entre 10.000 e 30.000.

Resultados semelhantes foram observados através de macrófagos previamente incubados com soro de animais portadores de insuficiência renal aguda. Como mostra a tabela 2, a atividade fagocitária na presença de soro urêmico foi de  $63,7 \pm 2,9\%$  e de  $60,2 \pm 3,4\%$  na presença de soro urêmico filtrado em membrana PM-30, valores estes significativamente diferentes dos obtidos na presença de soro normal ( $82,9 \pm 3,5\%$ ). Somente quando o soro urêmico foi filtrado em membrana PM-10, a atividade fagocitária foi igual ao normal ( $95,2 \pm 2,1\%$ ).

TABELA 2

Efeito do soro de ratos com insuficiência renal aguda (IRA) sobre a atividade fagocitária (%) de macrófagos em cultura.

	SORO			
	Normal	IRA	IRA PM-30	IRA PM-10
n =	12	11	13	6

IRA PM-30, IRA PM-10 correspondem ao soro de ratos filtrado em membranas PM-30 e PM-10. Os dados são média  $\pm$  erro padrão; \*;  $p < 0,01$  em relação ao normal; ★;  $p < 0,01$  em relação ao IRA; n: n° de culturas.

## DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram que macrófagos em cultura, apresentam uma menor atividade fagocitária de hemácias de carneiro sensibilizadas com hemolisina, quando ao meio de cultura é adicionado soro obtido de animais com insuficiência renal aguda ou crônica, sugerindo real-

mente a presença de um fator sérico inibidor da fagocitose.

Embora alguns autores tenham sugerido que monócitos (precursores de macrófagos) de pacientes urêmicos possuam menor atividade fagocitária de hemácias sensibilizadas com IgG, mesmo na presença de soro normal<sup>12</sup>, portanto, um defeito da própria célula e não do meio, a maioria dos estudos verificaram que o defeito deve-se à presença de um fator inibidor do soro urêmico. Talvez estas discrepâncias sejam devidas à fatores como população heterogênea de pacientes, diálise, etc<sup>1, 3, 7, 11, 12</sup>.

O estudo com células cultivadas "in vitro" permitiu-nos trabalhar com uma população mais homogênea, o que pode ser comprovado pelos valores médios da atividade fagocitária obtidos com as várias experiências controles realizadas e também pela pequena variação entre as diferentes culturas.

Outro aspecto interessante por nós observado é que este fator sérico aparece não só em animais com insuficiência renal com 3 semanas de evolução, como também 1 dia após a indução de insuficiência renal aguda por ligadura dos ureteres.

Os diferentes valores de uréia, cerca de 100 mg/dl nos animais com insuficiência renal crônica e 300 mg/dl nos ratos com insuficiência renal aguda, parecem não influenciar quantitativamente a inibição da fagocitose, o que era esperado, pois estudos anteriores mostraram que a uréia e a creatinina separadas e em conjunto em concentrações altas como 300 mg/dl e 10 mg/dl respectivamente, não alteram a função de macrófagos<sup>4</sup>.

Alguns experimentos sugerem que a inibição da fagocitose é parcialmente corrigida pela diálise peritoneal ou hemodiálise, portanto o fator ou fatores urêmicos seriam moléculas de baixo ou médio peso molecular<sup>3, 11</sup>.

Tentativas de isolar esta substância no soro urêmico mostraram, em alguns casos, tratar-se de uma molécula de médio peso molecular compreendido entre 500 e 4000 daltons<sup>11</sup>.

Nosso estudo mostrou, contudo, que tanto na insuficiência renal aguda como na crônica, o fator sérico responsável pela inibição parcial da fagocitose tem peso molecular entre 10.000 e 30.000 daltons, portanto, uma molécula de alto peso molecular e com restrição à diálise tanto pela membrana peritoneal como artificial. Essa observação leva a inferir que este defeito da imunidade deve persistir apesar do tratamento dialítico e que esta modalidade terapêutica pode não ser a solução final para o tratamento da insuficiência renal, continuando o paciente, sujeito ao risco de processo infeccioso.

## SUMMARY

### Inhibitory effect of serum from rats with acute and chronic renal failure on phagocytosis "in vitro".

The effect of serum obtained from rats with acute and chronic renal failure on phagocytosis was evaluated in macrophages cultured "in vitro". The erythrophagocytosis of these cells was lower after incubation with serum from rats with acute and chronic renal failure when compared to normal plasma. This inhibitory process persisted when the serum was previously filtered through a Millipore filter PM-30, but it was abolished when the serum was filtered through a Millipore filter PM-10. These data suggest that uremic plasma displays a inhibitory factor of phagocytic cells of a molecular weight between 10.000 and 30.000 daltons.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BROGAN, T. D. — Phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes from patients with renal failure. *Brit. med. J.*, 3: 596-599, 1967.
2. CAMERON, J. S. — Acute renal failure — the continuing challenge. *Quart. J. Med.*, 228: 337-343, 1986.
3. HALLGREN, R.; FJELLSTRÖM, K. E.; HAKANSSON, L. & VENGE, P. — Kinetic studies of phagocytosis — II. The serum-independent uptake of IgG-coated particles by polymorphonuclear leukocytes from uremic patients on regular dialysis treatment. *J. Lab. clin. Med.*, 94: 277-284, 1979.
4. JÖRSTAD, S. & VIKEN, K. E. — Inhibitory effects of plasma from uraemic patients on human mononuclear phagocytes cultured in vitro. *Acta path. microbiol. scand.*, 85: 169-177, 1977.

5. JÖRSTAD, S. & KVERNES, S. — Uraemic toxins of high molecular weight inhibiting human mononuclear phagocytes cultured in vitro. *Acta path. microbiol. scand.*, 86: 221-227, 1978.
6. MONTGOMERIE, J. Z.; KALMANSON, G. M. & GUZE, L. B. — Renal failure and infection. *Medicine*, 47: 1-32, 1968.
7. MONTGOMERIE, J. Z.; KALMANSON, G. M. & GUZE, L. B. — Leukocyte phagocytosis and serum bactericidal activity in chronic renal failure. *Amer. J. med. Sci.*, 264: 385-393, 1972.
8. NAVARRO, J.; GROSSETETE, M. C.; DEFASNE, A.; TOURAINE, J. L. & TRAEGER, J. — Isolation of an immunosuppressive fraction in ultrafiltrate from uremic sera. *Nephron*, 40: 396-400, 1985.
9. PURKERSON, M. L.; HOFFSTEN, P. E & KLAHR, S. — Pathogenesis of the glomerulopathy associated with renal infarction in rats. *Kidney Int.*, 9: 407-417, 1976.
10. RASKOVA, J. & MORRISON, A. B. — Humoral inhibitors of the immune response in uremia. I. Effect of serum and of the supernatant of spleen cultures from uremic rats on the mixed lymphocyte reaction. *Lab. Invest.*, 38: 103-109, 1978.
11. RINGOIR, S. M. G.; VAN LANDSCHOOT, N. & DE SMET, R. — Inhibition of phagocytosis by a middle molecular fraction from ultrafiltrate. *Clin. Nephrol.*, 13: 109-112, 1980.
12. URBANITZ, D. & SIEBERTH, H. G. — Impaired phagocytic activity of human monocytes in respect to reduced antibacterial resistance in uremia. *Clin. Nephrol.*, 11: 13-17, 1978.

Recebido para publicação em 12/3/1990.